

Scientific Note

Primeiro registro de *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) sobrevivendo em soja Bt no Brasil

Adriana C. Nardon¹, Sandra M. Mathioni¹, Leandro V. dos Santos¹, Daniel D. Rosa¹

Syngenta Proteção de Cultivos, São Paulo, São Paulo, Brasil.

 Corresponding author: daniel.rosa@syngenta.com

Edited by: Leandro D. Geremias

Received: June 09, 2021. Accepted: September 19, 2021. Published: September 24, 2021.

First record of *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) (Lepidoptera: Noctuidae) surviving on Bt soybean in Brazil

Abstract. Loopers are important defoliators in several crop species. Among the loopers attacking non-Bt soybean cultivars, *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) was the most common. The use of transgenic Bt soybean in approximately 70% of the soybean fields in Brazil led to a decrease in the loopers in these fields. However, technical field specialists and soybean producers recently observed Plusiinae larvae damaging transgenic Bt soybean, posing a risk over the Bt technology. Therefore, the aim of this study was to identify and confirm the caterpillar species feeding on transgenic Bt soybean fields in Brazil. Larvae and soybean leaf samples were collected in 12 soybean-producing locations from four Brazilian States. Soybean leaf samples were tested to confirm whether they were transgenic Bt. Larvae were reared in artificial diet and submitted to feeding trials on non-transgenic and transgenic Bt soybean leaves. The species identification was performed by amplicon sequencing of the cytochrome oxidase I (COI) gene of eight larvae per local. All 12 populations fed in the transgenic Bt soybean and the sequencing analysis of COI determined that they belong to *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) with 100% similarity to the COI sequences available in NCBI for this species. These results suggest that the *R. nu* species is not controlled by the genetic modification event present in the tested soybean variety and highlights the need for additional looper management control strategies, such as insecticide application, for controlling this insect pest in transgenic Bt soybean.

Keywords: Soybean, soybean looper, insect, pest, sunflower looper.

A agricultura brasileira, e mais especificamente a sojicultura, vêm enfrentando novos desafios fitossanitários. A cultura da soja passou recentemente por um processo de introdução de materiais transgênicos resistentes a lagartas (conhecidos como soja Bt, que expressa a proteína Cry1Ac), resultando no controle de diversas espécies. Porém, observou-se o aumento de espécies que antes não eram prioritárias ou pragas diretas como *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (revisado em [Pozebon et al. 2020](#)).

Com o aumento do uso da soja Bt para aproximadamente 70% da área plantada no Brasil, as lagartas conhecidas comumente como lagartas falsa-medideiras ou mede-palmo foram controladas efetivamente nas lavouras ([Perini et al. 2020](#)). As lagartas pertencentes à subfamília Plusiinae têm grande importância na cultura da soja devido aos elevados danos ocasionados pela desfolha e a dificuldade de controle ([Sosa-Gómez et al. 2010](#)). Entre as espécies de Plusiinae, as mais importantes em soja são *Chrysodeixis includens* (Walker, [1858]) e *Rachiplusia nu* (Guenée, 1852) ([Moraes et al. 1991](#); [Moscardi et al. 2012](#)). As duas espécies são controladas pela soja Bt, porém, na safra de 2020/21 observou-se em diversas regiões a ocorrência de lagartas falsa-medideira em áreas de cultivo de soja Bt. Frente a essa observação do ressurgimento das lagartas “Plusias”, foi realizado um estudo investigativo para confirmar se as variedades atacadas realmente expressavam a proteína Bt e, identificar as lagartas que estavam se alimentando dessas variedades.

Foram coletadas lagartas falsa-medideiras e plantas de soja em 12 locais (Tab. 1, Fig. 1), sendo as lagartas para testes em laboratório e as plantas para verificação do evento transgênico. Todos os materiais foram encaminhados para o laboratório de monitoramento de inseticidas da Syngenta Proteção de Cultivos, na cidade de Holambra, no Estado de São Paulo. No laboratório as plantas coletadas de cada local foram submetidas ao teste de verificação de evento transgênico, utilizando o kit QuickStix - Detecção Cry1Ac em Folhas e Sementes de Soja (AS-433-LS) da empresa Envirológix.

Para os bioensaios com as lagartas, foram coletadas aproximadamente 300 lagartas por local. Estas foram individualizadas em potes plásticos (modelo G-695 Galvanotek) contendo 15 mL da dieta artificial ([Greene et al. 1976](#)).

Assim que as lagartas chegaram ao laboratório, foi realizada uma triagem de acordo com as fases imaturas. As pupas foram transferidas para gaiolas de PVC (20 cm de altura e 15 cm de diâmetro) revestidas internamente com papel sulfite tamanho A4, contendo na extremidade inferior uma placa de Petri de 15 cm de diâmetro, papel filtro circular e um recipiente plástico com uma solução de mel na concentração 10% embebido em algodão para a alimentação dos adultos. As gaiolas foram cobertas por tecido tipo “voil” preso com elástico de borracha. Para manter a viabilidade da criação foram realizadas as trocas dos recipientes com solução de mel e a retirada das posturas três vezes na semana, para evitar contaminação bem como a eclosão dos ovos dentro das gaiolas contendo os adultos.

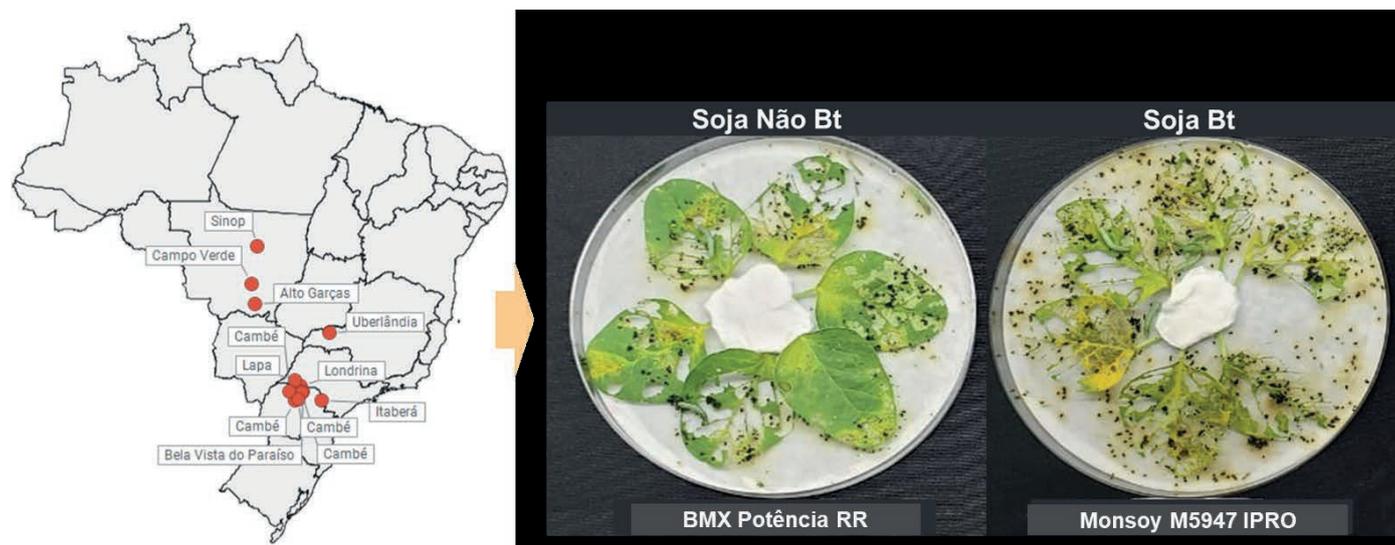
As posturas foram transferidas para copos plásticos de 400 mL (Copaza) contendo dieta artificial e as lagartas ao atingirem o terceiro instar, foram individualizadas em copos plásticos de 100 mL (Copaza) contendo 30 mL de dieta artificial para dar continuidade a criação no laboratório e uma parte das lagartas foram submetidas aos testes. A criação foi mantida em sala climatizada, com temperatura de 25 ± 1 °C, umidade relativa do ar de 60% ± 10% e fotofase de 12 horas.

Para o teste de herbivoria em soja transgênica Bt, foram semeadas em casa de vegetação as cultivares M5947 IPRO (transgênica Bt) e a BMX Potência RR (não Bt). Quando as plantas atingiram o estágio de V5 foram coletadas as folhas e ofertadas para as lagartas de estágio L2 (segundo instar) em placas de Petri, sendo alocados seis folíolos por placa, com uma lagarta por folíolo e total de seis lagartas em cada placa, utilizando-se de quatro repetições por população. As lagartas foram mantidas por 48h em sala de criação à 25 ± 1 °C e fotofase de 12 horas.

Para a extração de DNA de cada lagarta individualizada foi utilizado

Tabela 1. Local com ataques de lagarta falsa-medideira em soja Bt, identificação da espécie coletada, e mortalidade em laboratório em folhas de soja não Bt e soja Bt.

Local	Espécie	Estado	Município	Latitude	Longitude	Mortalidade (%)	
						BMX POTÊNCIA RR (não Bt)	M5947 IPRO (Cry1Ac)
1	<i>Rachiplusia nu</i>	Mato Grosso	Campo Verde	-15.2396	-54.8813	0	12
2	<i>Rachiplusia nu</i>	Mato Grosso	Sinop	-11.8717	-55.7233	0	0
3	<i>Rachiplusia nu</i>	Mato Grosso	Alto Garças	-17.0007	-53.5210	0	15
4	<i>Rachiplusia nu</i>	Minas Gerais	Uberlândia	-18.9383	-48.1725	0	0
5	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Londrina	-23.1371	-51.1994	0	8
6	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Lapa	-23.1009	-51.0903	0	6
7	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Bela Vista do Paraíso	-23.0208	-51.1914	0	1
8	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Cambé	-23.1850	-51.2099	0	9
9	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Cambé	-23.1428	-51.2095	0	8
10	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Cambé	-23.2247	-51.2449	0	0
11	<i>Rachiplusia nu</i>	Paraná	Cambé	-23.2421	-51.2508	0	0
12	<i>Rachiplusia nu</i>	São Paulo	Itaberá	-23.7951	-49.0127	0	12
Média							5,9


Figura 1. Mapa dos locais de coleta e consumo de folhas de soja não Bt (BMX Potência RR) e em soja Bt (Monsoy M5947) por *Rachiplusia nu* (Lepidoptera: Noctuidae).

o kit Wizard (Promega) seguindo as instruções do fabricante. Foram sequenciadas oito lagartas de cada população coletada. Para a identificação da espécie foi amplificado, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), um fragmento do gene citocromo oxidase I (cytochrome oxidase I, COI) usando os primers descritos anteriormente (Folmer et al. 1994; Simon et al. 1994). O amplicon obtido foi sequenciado usando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) no instrumento 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). A sequência consenso obtida foi depositada no Genbank com o número de acesso MZ328128. As análises de alinhamento e BLAST foram realizadas usando ClustalW (Thompson et al. 1994).

Os testes de detecção do evento Cry1Ac apresentaram resultados positivos para todas as plantas coletadas, confirmando que plantas com o evento Cry1Ac estavam sendo atacadas por lagartas falsa-medideira (Tab. 1). No teste de herbivoria, houve alto consumo foliar em ambas variedades (Bt e não Bt) (Fig. 1) após 48 horas de exposição das lagartas.

Em relação a mortalidade, verificou-se que a mortalidade foi zero nas populações expostas a soja convencional (não Bt). Já os indivíduos das mesmas populações expostos a soja Bt, os valores de mortalidade variaram de zero a 15%, apresentando uma mortalidade média total das populações de 5.9% (Tab. 1).

A análise do sequenciamento do gene COI mostrou 100% de similaridade (MZ328128.1) das sequências com as sequências desse mesmo gene que estão depositadas no banco de sequências (Genbank, NCBI) com a espécie *R. nu*. A identificação por técnicas moleculares é uma ferramenta importante visto a dificuldade de identificação a campo por caracteres morfológicos das espécies *R. nu* e *C. includens*.

Dos 12 locais de coleta, verificou-se que 100% das lagartas pertenciam a *R. nu*, e em todos os locais as lagartas estavam se alimentando em cultivares de soja Bt, demonstrando que essa espécie não está sendo controlada totalmente pelo evento Cry1Ac e que devido ao histórico de dano das plusias em soja, medidas de controle complementares podem ser necessárias. O uso de inseticidas e/ou outras medidas de controle eficientes, devem ser parte integral das boas práticas de manejo das lavouras de soja, visando o controle de lagartas.

Essas populações detectadas em diversas regiões do Brasil, presentes em soja Bt, sinalizam que *R. nu* está se adaptando a soja Bt e que se faz necessário reavaliar as estratégias de controle de plusia em soja, manejo atualmente esquecido, devido a adoção da tecnologia Bt.

Historicamente, a presença de *R. nu* era limitada a estados do sul do Brasil e a Argentina (Perini et al. 2021), e assim, a detecção em diversas regiões do Brasil sinaliza uma provável adaptação ambiental

dessa espécie. Portanto, se faz necessário mais estudos para entender melhor a competição interespecífica das espécies de Plusiinae, pois anteriormente ao advento da soja Bt esse nicho ecológico era ocupado predominantemente por *C. includens*, e podendo agora ser ocupado por *R. nu* como uma nova desfolhadora em soja. Além disso, são necessários estudos sobre a predominância de cada espécie de Plusiinae em campos de soja e quais são as variações dos níveis de suscetibilidade das populações de *R. nu* a proteína Cry1Ac para definir em âmbito regional as melhores estratégias de manejo da resistência.

Este é o primeiro relato de *R. nu* sobrevivendo em soja Bt (Cry1Ac) a campo no Brasil.

Contribuições dos autores

ACN, SMM e DDR planejaram e projetaram as pesquisas. ACN e SMM realizaram os experimentos e análises de dados. ACN, SMM, DDR e LV escreveram o artigo. Todos os autores leram, aprovaram o manuscrito e contribuíram substancialmente para o trabalho.

Referências

- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Greene, G. L.; Leppla, N. C.; Dickerson, W. A. (1976) Velvetbean caterpillar: a rearing procedure and artificial medium. *Journal of Economic Entomology*, 69(4): 447-448.
- Moraes, R. R.; Loeck, A. E.; Belarmino, L. C. (1991) Inimigos Naturais de *Rachiplusia nu* (GUENÉE, 1852) e de *Pseudoplusia includens* (WALKER, 1857) (LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE) em Soja no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 26(1): 57-64.
- Moscardi, F.; Bueno, A. F.; Sosa-Gómez, D. R.; Roggia, S.; Hoffmann-Campo, C. B.; Pomari, A. F.; Corso, I. C.; Yano, S. A. C. (2012) Artrópodes que atacam as folhas da soja. In: Hoffmann-Campo, C. B.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Moscardi, F. (Eds.), *Soja: manejo integrado de insetos e outros artrópodes-praga*, pp. 213-334. Londrina: Embrapa.
- Perini, C. R.; Stacke, R. F.; Stacke, R. S.; Froehlich, R.; Machado, D. N.; Puntel, V. L.; Ceolin, M.; Daltrozo, W. B.; Guedes, J. C. (2020) Lacy horizon. *Revista Cultivar*. <https://www.grupocultivar.com.br/ativemanager/uploads/arquivos/artigos/bab64942e191a19b96e1e84a1c4aeb97.pdf>. Acessado em: 9.vi.2021.
- Perini, C. R.; Sosa, V. I.; Koda, V. E.; Silva, H.; Risso, A. A.; Vasconcelos, W. N. F.; Gonçalves, C. F.; Ugalde, G. A.; Machado, D. N.; Bevilacqua, C. B.; Ardisson-Araújo, D. M.; Maebe, K.; Smagghe, G.; Valmorbida, I.; Guedes, J. C. (2021) Genetic structure of two Plusiinae species suggests recent expansion of *Chrysodeixis includens* in the American continent. *Agricultural and Forest Entomology*, 23: 250-260. doi: [10.1111/afe.12427](https://doi.org/10.1111/afe.12427)
- Pozebon, H.; Marques, R. P.; Padilha, G.; O'Neal, M.; Valmorbida, I.; Bevilacqua, J. G.; Tay, W. T.; Arnemann, J. A. (2020) Arthropod invasions versus soybean production in Brazil: a review. *Journal of Economic Entomology*, 113(4): 1591-1608. doi: [10.1093/jee/toaa108](https://doi.org/10.1093/jee/toaa108)
- Simon, C.; Frati, F.; Beckenbach, A.; Crespi, B.; Liu, H.; Flook, P. (1994) Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.
- Sosa-Gómez, D. R.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Hoffmann-Campo, C. B.; Corso, I. C.; Oliveira, L. J.; Moscardi, F.; Panizzi, A. R.; Bueno, A. F.; Hirose, E. (2010) *Manual de identificação de insetos e outros invertebrados da cultura da soja*. Londrina: Embrapa Soja.
- Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22: 4673-4680.